

UNIVERZITETNI DOKTORSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

SEMINAR pri predmetu Temeljna medicinska mikrobiologija

Tina Korać

**INTERAKCIJE MED GENOMOM IN VIROMOM:
VLOGA POGOSTIH VIRUSNIH OBOLENJ V PATOGENEZI
KOMPLEKSNIH BOLEZNI**

MODERATOR SEMINARJA

prof. dr. Srečko Koren

LJUBLJANA, 12.03.2012

Izveček

Naše razumevanje nastanka nekaterih kompleksnih bolezni - tistih, pri katerih so vključeni tako genetski kot tudi okoljski dejavniki tveganja, se je z razvojem diagnostičnih metod močno spremenilo. Virusi, ki so vpleteni v nastanek omenjenih bolezni, povzročajo okužbe sluznic človeškega organizma, ki prizadenejo večino prebivalstva, vendar so ponavadi asimptomatske ali le blago izražene. Pri nekaterih posameznikih pa enake virusne okužbe predstavljajo pomemben okoljski dejavnik v patogenezi kompleksnih bolezni. Zaradi teh razlik si je potrebno prizadevati za boljše razumevanje interakcij gostiteljevega protivirusnega odziva s človeškim viromom. V seminarju bomo predstavili interakcije med gostiteljem in virusi pri treh boleznih: sladkorni boleznii tipa 1, Crohnovi boleznii in astmi.

Vsebina

Sluznice predstavljajo vstopno mesto ne le za snovi, ki so bistvenega pomena za preživetje, ampak tudi za številne povzročitelje bolezni, vključno z virusi. Da bi se zaščitili, so gostitelji razvili številne obrambne protivirusne imunske mehanizme. Ko se virus pritrdi na površino sluznice, pride do interakcije med virusom in gostiteljevim imunskim sistemom, kar na koncu odloči o resnosti in izidu okužbe.

Kot vse ostale lastnosti, je gostiteljev protivirusni odgovor delno predeterminiran zaradi same genetike in lahko variira v populaciji glede na genetske polimorfizme. Med gostitelji se na primer razlikujejo tudi celični površinski receptorji, ki jih uporabljajo virusi za pritrditev. Napredek v zmožnosti detekcije virusov je popolnoma spremenil pogled na virusne okužbe sluznic pri ljudeh in drugih gostiteljih. Virusi so namreč pogosto prisotni v odsotnosti jasne bolezni. Če se osredotočimo na pogoste, manj virulentne okužbe, potem so razlike v gostiteljevem protivirusnem odgovoru izjemno pomembne pri nastanku fiziološkega odgovora na virusno okužbo.

V seminarju bomo razpravljali o tem, kako je razvoj genetskih in genomskih tehnologij spremenil naš pogled na virusne okužbe. V nasprotju z modelom: en patogen ena bolezen, bomo opisali model človeškega viroma, v katerem so ljudje nenehno izpostavljeni virusom, ki lahko ali pa ne povzročajo simptomov. Virom je pomemben sestavni del okolja, ki lahko vzajemno deluje z gostiteljevimi genetskimi lastnostmi in prispeva k patogenezi kompleksnih bolezni (1,2). Osredotočili se bomo na sladkorno bolezen tipa 1 (SB1), Crohnovo bolezen in astmo kot primere kompleksnih bolezni, pri katerih so interakcije med gostiteljevo genetsko zasnovo in virusno okužbo vpletene v nastanek avtoimune in vnetne bolezni.

Človeški virom

PCR in druge genetske metode so izjemno izboljšale naše zmožnosti odkrivanja virusov v vzorcih okuženih posameznikov. Včasih so s klasičnimi epidemiološkimi študijami iskali viruse, ki so povzročali pogoste okužbe dihal in prebavil. Te študije so bile zelo informativne, vendar je bilo zaznavanje virusov precej nižje, kot je mogoče s sodobnimi metodami. Na primer, v študiji Tecumseh, ki je bila izvedena med 1965 in 1969 v ZDA,

so od 1419 vzorcev respiratornih izločkov pri bolnikih s simptomatsko okužbo dihal povzročitelja odkrili le pri četrtni bolnikov (3). Za razliko so leta 1998 opravili študijo s PCR, kjer so kar pri 69% testiranih odraslih s prehladom identificirali povzročitelja, večinoma rinoviruse (v 50% primerov) (4). Poleg izboljšav pri samem odkrivanju virusov, so sodobne metode pomagale odkriti številne prej neznane virusne patogene in izpostavile pogosto prisotnost virusov pri zdravih posameznikih. Na površini sluznic so pomembni predvsem rinovirusi in enterovirusi. Rinovirusi pogosto kolonizirajo našo sluznico dihal brez simptomov, kar kaže, da se interakcije med virusi in protivirusnim delovanjem našega imunskega sistema lahko pojavijo tudi, ko se ne zavedamo okužbe. Vedno več je dokazov, da so pogoste virusne okužbe sluznic pomemben dejavnik pri patogenezi kompleksnih bolezni. Če upoštevamo simptomatske in asimptomatske okužbe je jasno, da so virusi pogosto, če ne vedno, prisotni na naših sluznicah. Namesto modela: en patogen-ena bolezen, se predlaga nov model, kjer konstantna (čeprav spreminjajoča se) prisotnost sluzničnih okužb predstavlja virom, ki je v nenehni interakciji z gostiteljevimi protivirusnim odzivom. Ta model poudarja potencialni pomen genetskih polimorfizmov v gostiteljevem protivirusnem odzivu pri določanju njegove dovzetnosti za nastanek kompleksnih bolezni (1).

Prebavni trakt: Chronova bolezen in sladkorna bolezen tip 1

Že vrsto let znanstveniki preučujejo infekcijske vzroke za nastanek avtoimunskih bolezni. Podobno kot okužbe, avtoimunske bolezni vključujejo aktivacijo imunskega odziva in kasnejše vnetje, vendar pa ni jasne vzročne povezave s specifičnim patogenom. V zadnjih nekaj letih so bile avtoimunske bolezni temeljito preučevane z asociacijskimi študijami na celotnem genomu (*angl. genome-wide association studies, GWA*). Raziskovalci so uporabili različne pristope, da bi opredelili, kako so geni, opredeljeni v GWA študijah, povezani s patogenezo bolezni.

Sladkorna bolezen tip 1

Sladkorna bolezen tipa 1 (SB1) je avtoimunska bolezen z genetskimi in okoljskimi komponentami. Ponavadi se pojavi v otroštvu, ko imunski sistem napade beta celice v Langerhansovih otočkih, ki proizvajajo insulin. To navadno vodi k doživljenjski odvisnosti od eksogeno pridobljenega insulina in mnogih dolgoročnih zdravstvenih posledic. Čeprav se bolezen pogosteje pojavlja v družinah, konkordanca med enojajčnima dvojčkoma ni 100 %.

Študije z uporabo metod GWA so potrdile povezavo med SB1 in polimorfizmi v humanih levkocitnih antigenih HLA-DR in HLA-DQ. Ta regija kodira molekule kompleksa tkivne skladnosti razreda II (MHC II), ki predstavljajo antigenske peptide limfocitom T CD4+. To pomeni, da odziv pridobljenega imunskega sistema prispeva k patogenezi sladkorne bolezni. Leta 2006 je bilo odkrita povezava med SB1 in nukleotidnim polimorfizmom v genu, ki kodira MDA5 (5). Gre za citoplazemsko helikazo, ki deluje kot neke vrste imunski senzor virusne okužbe. MDA5 je izražen v citosolu. Ko zazna prisotnost virusne RNA, MDA5 sproži signal celici za proizvodnjo interferonov tipa I (IFN), kar posledično sproži protivirusni imunski odziv. Velika populacijska študija je pokazala, da je MDA5 bolj izražen v levkocitih posameznikov s SB1-dovzetnimi aleli, kot pri tistih s SB1 rezistentnimi aleli (6), kar pomeni, da obstaja povezava med močjo protivirusnega imunskega odziva in patogenezo SB1.

Nedavno so bile opravljene analize mreže genske ekspresije, ki jo določa transkripcijski faktor IRF7 (interferon regulativni faktor 7). To je glavni regulator genov, ki kodirajo IFN tipa I in so odgovorni za njegovo sintezo (7). SNP-ji, ki so povezani z dovzetnostjo za nastanek SB1, povzročajo večje izražanje celotne mreže signalnih poti, ki potekajo preko IRF7. Če razvoj SB1 povzročijo spremembe v protivirusnem odgovoru, ostaja vprašanje, kateri virusi inducirajo ta odgovor. Čeprav so bili raziskani mnogi patogeni, so najverjetnejši povzročitelji enterovirusi, kot so coxsackievirusi B (oz. človeški enterovirusi B). Vpletenost enterovirusov v nastanek SB1 je potrdilo več študij. Že leta 1979 so preiskovalci izolirali človeški coxsackievirus B4 iz trebušne slinavke umrlega otroka s SB1. Cepljenje miši s tem virusom je povzročilo vnetje trebušne slinavke in smrt beta celic (8). Vloga enterovirusov v patogenezi SB1 še ni jasno opredeljena,

mogoči pa so številni patogenetski mehanizmi. Po okužbi beta celice z enterovirusi sledi njeno uničenje kot posledica same okužbe z virusom, imunskega odziva, ki ubija z virusom okužene celice, ali avtoimunskih posledic take okužbe.

Okužbe z enterovirusi so zelo pogoste in ponavadi ne privedejo do diabetesa, kar pomeni, da so potrebni dodatni genetski dejavniki gostitelja (ali virusa). Poleg tega je v tipični nalezljivi bolezni povzročitelj bolj patogen pri posameznikih z zmanjšanim imunskim odzivom (npr. pri imunosupresiji). Močan protivirusni odgovor sovpada s tveganjem za SB1. Torej je gostiteljev imunski odziv na virus bolj patogen kot virus sam. SB1 bi lahko predstavljala bolezen, ki jo povzroča virusna okužba skupaj s škodljivim odgovorom gostitelja, ki izhaja delno iz genotipa in deloma iz drugih okoljskih dejavnikov (1). Jasno je, da bodo potrebne nadaljnje študije vloge virusov v SB1, vendar kaže, da je enterovirusna okužba ključni okoljski dejavnik v njeni patogenezi.

Chronova bolezen

Crohnova bolezen je kronična vnetna črevesna bolezen, ki se ponavadi pojavlja pri mladih odraslih. Gre za transmuralno vnetje črevesne stene. Vnetje se običajno pojavi v distalnemu ileumu in debelem črevesju, ki sta gosto poseljena z bakterijami, čeprav se lahko pojavi tudi v ostalih področjih prebavnega trakta. Navadno se pojavijo simptomi v epizodah, vključno z občasno povišano telesno temperaturo, bolečinami v trebuhu in drisko, lahko pa tudi s hujšimi zapleti, kot so nastanki abscesov, fistul. Dejavniki tveganja za razvoj Crohnove bolezni so genetski in okoljski, s približno 60 % konkordanco pri enojajčnih dvojčkih.

V poznih 1990-ih so genomske študije pokazale povezavo med številnimi kromosomskimi regijami in pojavom Crohnove bolezni. Prvi odkrit gen, povezan s Crohnovo boleznijo, je NOD2 (*angl. nucleotide-binding oligomerizing domain-containing protein 2*), ki kodira receptor prirojenega imunskega sistema, ki prepoznava sestavine bakterijske celične stene (9). Kasneje so genetske raziskave ugotovile vlogo

številnih drugih genov pri nastanku Crohnove bolezni, večina od njih ima vlogo v imunoloških poteh ali v funkciji epiteljskih pregrad.

Te ugotovitve so v skladu z veljavno hipotezo, da je patogeneza Crohnove bolezni povezana z okvaro v običajnih homeostatičnih interakcijah med gostiteljem in bakterijskim mikrobiomom v črevesju. Poleg tega so številne študije povezale Crohnovo bolezen z ATG16L1 in IRGM, ki sta vključena v avtofagijo (10). Avtofagija je celični proces, ki je pomemben za odstranjevanje odpadnih produktov iz citosola. V imunski obrambi je avtofagija pomembna tako za odstranitev patogenov kot za njegovo prepoznavanje. Beljakovina ATG16L1 ima tri različne vloge, ki so lahko vse pomembne pri Crohnovi bolezni. Prvič, ATG16L1 lahko interagira z receptorji prirojene imunosti NOD1 in NOD2, ki regulirajo avtofagijo bakterij. Drugič, zmanjšano izražanje ATG16L se kaže v prekomernem sproščanju pro-vnetnih citokinov IL-1b po stiku z lipopolisaharidom. Tretjič, ATG16L1 najverjetneje sodeluje pri fiziologiji Panethovih celic, ki so črevesnih kriptah in sproščajo protimikrobne spojine in druge snovi, ki vplivajo na žive mikroorganizme v črevesju.

V miši z zmanjšanim izražanjem ATG16L so v Panethovih celicah prikazali strukturne anomalije njihovih sekrecijskih zrn in spremenjen profil genskega izražanja. Ta mišji model ima verjetno vzporednice s Crohnovo boleznijo. Tu je bila prvič odkrita vloga virusov v patogenezi Crohnove bolezni: črevesni norovirusi so namreč bistvenega pomena za spremenjen fenotip Panethovih celic pri miših z zmanjšanim izražanjem ATG16L1 (11). Za boljše razumevanje modela Crohnove bolezni, so miši izpostavili še natrijevemu dekstransulfatu (DSS), spojini, ki povzroča črevesne poškodbe in ob zaužitju daje KVČB-ju podoben fenotip. Okužene miši so imele spremenjen odziv na poškodbe črevesja, s patologijo, podobno tisti pri ljudeh s Crohnovo boleznijo. Ta fenotip je bil specifičen za virusni sev in je tudi zahteval prisotnost črevesnih bakterij, saj je zdravljenje z antibiotiki zaščitilo miši pred boleznijo. Mehanizem, s katerim okužba z norovirusi vpliva na Panethove celice, je še vedno predmet raziskav. Kljub temu pa ti rezultati predstavljajo zanimiv eksperimentalni dokaz, kako lahko virusna okužba močno vpliva na izražanje kompleksne bolezni (1). Omeniti velja, da so črevesni

norovirusi pogosti patogeni, ki jih pogosto najdemo v miših po vsem svetu in ponavadi niso simptomatski.

Respiratorni trakt: Astma

Astma spada med najpogostejše kronične pljučne bolezni. Gre za obstruktivno vnetno bolezen spodnjih dihal, za katero so značilna občasna poslabšanja. Čeprav je znano mnogo genetskih in okoljskih dejavnikov tveganja, patogeneza astme še ni popolnoma pojasnjena. Bolezen prizadane približno 300 milijonov ljudi po vsem svetu. Dolgoročne posledice se lahko kažejo s kroničnim vnetjem in spremembami v strukturi in delovanju pljuč. Astma se pogosto pojavlja v povezavi z alergijami, vendar je kljub temu heterogena motnja, saj se bolezni v popolnosti ne da pojasniti z alergijski mehanizmi.

Obstaja vedno več študij, ki povezujejo patogenezo astme z respiratornimi virusi, zlasti človeškimi rinovirusi. Čeprav je znano, da inhalacijski alergeni lahko sprožijo napad astme, so longitudinalne študije, izvedene leta 1990, pokazale, da je 80-85% poslabšanj pri bolnikih z astmo povezanih z dihalnimi okužbami (12). Najpogosteje odkriti patogen je rinovirus, in sicer kar v 60% ali več (12). Nedavne študije (s PCR) so človeške rinoviruse odkrile pri skoraj 90% otrok s hudimi poslabšanji astme (13). Novo odkriti človeški rinovirus skupine C bi lahko bil še posebej pomemben, čeprav so potrebne dodatne študije za razjasnitev vloge različnih podtipov rinovirusov. Tudi epidemiološki podatki kažejo povezavo z rinovirusi, saj se število hospitalizacij zaradi astme pri otrocih močno poviša z vrhom rinovirusnih okužb, torej približno 2 tedna po pričetku šolskega leta. V nedavni študiji so pri kohorti 259 otrok (14) od rojstva spremljali veliko dejavnikov tveganja za razvoj astme, vključno z epizodami hudih okužb dihal s piskanjem. Otroci, ki so preboleli hudo okužbo z rinovirusom pred 3 letom starosti, so razvili astmo do starosti 6 let v skoraj 90% primerov.

Ostaja vprašanje ali so osebe z astmo bolj dovzetne za okužbo z rinovirusom. Trenutno obstajajo tri možnosti: posamezniki z astmo (ali z nagnjenostjo k astmi) so bolj dovzetni za rinoviruse; rinovirusne okužbe poškodujejo pljuča in prispevajo k razvoju astme; ali pojav obeh procesov skupaj, mogoče sinergistično. Bolniki z astmo in zdravi zbole vajo

z rinovirusnimi okužbami enako pogosto, vendar imajo tisti z astmo podaljšano okrevanje in hujše simptome okužbe. Poleg tega rinovirusne okužbe pri bolnikih z astmo povzročijo več simptomov okužbe spodnjih dihal. *Ex vivo* študije so pokazale povečano razmnoževanje virusa in zmanjšane IFN odzive v epitelnih celic dihalnih poti pri bolnikih z astmo v primerjavi s kontrolnimi skupinami. Vse kaže na to, da imajo bolniki z astmo spremenjen imunski odziv na okužbo z rinovirusi, s hujšimi patološkimi spremembami v spodnjih dihalih, vendar navedene ugotovitve ne pojasnijo, ali je ta odgovor posledica bolezni ali del osnovnega vzroka.

Če imajo bolniki z astmo spremenjen imunski odziv na rinoviruse, je verjetno, da je spremenjena interakcija med gostiteljem in virusom ključnega pomena za patogenezo astme. Skoraj vsi otroci se srečujejo z rinovirusi v zgodnjem otroštvu, s stopnjo serokonverzije 90% do drugega leta starosti (15). Okužbe z rinovirusi se pojavljajo vsaj vsakih nekaj mesecev, z novimi epidemijami vsako leto. S stalno izpostavljenostjo tem virusom si ni težko predstavljati, kako lahko okvarjen odziv na okužbo rinovirusi povzroči akutne in/ali kronične pljučne poškodbe. Lahko predpostavimo, da je okužba z rinovirusi pomembna pri nastanku astme, vsaj pri nekaterih bolnikih s to heterogeno boleznijo. Doslej so opazovanja bolnikov predstavljala glavni vir dokazov za spremenjen odgovor na rinoviruse pri bolnikih z astmo. GWA študije pa so potrdile več polimorfizmov, ki pogosto pojavljajo v imunoloških poteh in ki bi lahko vplivale na interakcije med gostiteljem in virusi (npr. polimorfizmi v TLR). V interakcije med gostiteljem in rinovirusi je vpletena prirojena imunost, vključno s signalnimi potmi preko TLR3 in RLR.

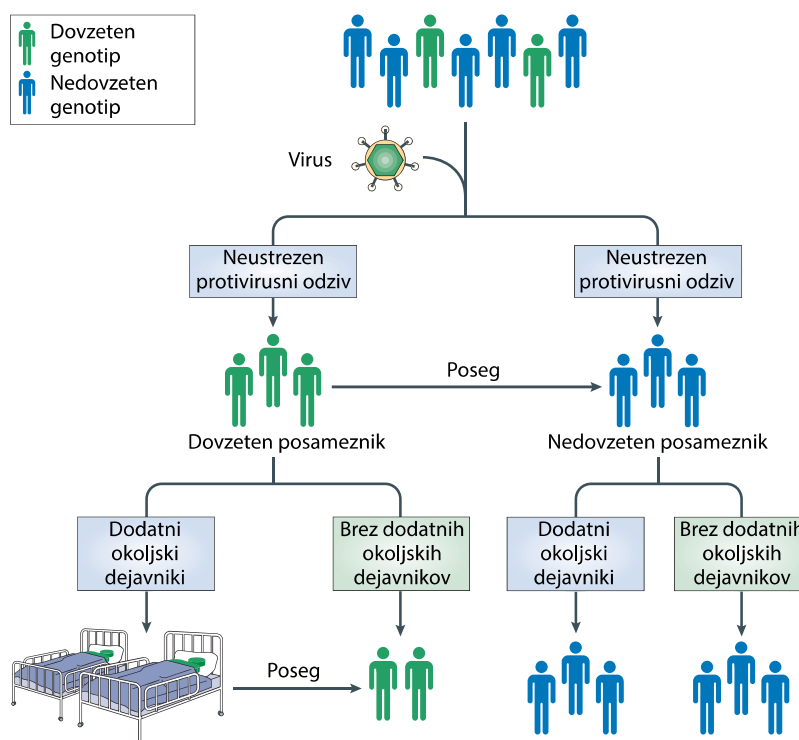
Hudi simptomi rinovirusne okužbe so do neke mere povezani s preobčutljivostjo na alergene. Možno je, da okužba spodnjih dihal z rinovirusi povzroči to preobčutljivost ali obratno, oziroma da skupni genetski polimorfizem predisponira gostitelja k obema fenotipoma. Polimorfizem v TLR bi lahko povzročil pristranost imunskega sistema za alergijsko senzibilizacijo in tudi spodbudil vnetje, povzročeno z rinovirusno okužbo. Čeprav patogeneze astme še ni popolnoma pojasnjena, je vse več dokazov, da igra interakcija med gostiteljem in virusom pri tem pomembno vlogo (1).

Kronične okužbe in endogeni virusi

Človeški virom obsega mnogo več kot le zgoraj omenjene pogoste okužbe sluznic. Sodobne diagnostične metode so pokazale, da smo ljudje nosilci velikega števila kroničnih virusnih okužb, mnoge od katerih imajo še neznane posledice. Pri ljudeh predstavljajo endogeni retrovirusi približno 8% genoma. Zanimivo je, da čeprav je večina endogenih človeških virusov defektnih, saj ne morejo ponovno oblikovati celovitih virusnih delcev, lahko vseeno izrazijo določene gene teh zaporedij. Odprto ostaja vprašanje ali in v kakšnem obsegu lahko endogeni virusi vplivajo na gostitelja oziroma se vključijo v njegov protivirusni imunski odziv (1).

Zaključek

Tradicionalno smo virusne okužbe sluznic obravnavali kot odstopanje od homeostaze gostitelja. Najprej je bila prisotna bolezen, nato je prišlo do ozdravitve. Nova dognanja kažejo na drugačno stanje, v katerem so virusne okužbe stalno prisotne. V nasprotju s študijami človeškega bakterijskega mikrobioma, je študij, ki preučujejo prisotnost virusov v sluznicah zdravih oseb z uporabo sodobnih tehnologij, zelo malo. Študije, ki so bile izvedene, kažejo na veliko pojavnost virusnih okužb v dihalih in prebavnem traktu, čeprav so le-te mnogokrat asimptomatske. Predlagan je bil nov model, v katerem so virusne okužbe sluznic prej pravilo kot izjema, in predstavljajo pogost (ali celo stalen, čeprav spreminjajoč se) virom. Pri dovzetnih posemeznikih lahko virusna okužba prispeva k patogenezi kompleksnih bolezni (slika 1).



Slika 1: Model vloge pogostih virusnih okužb v patogenezi kompleksnih bolezni (1).

Nobena študija še ni opredelila človeškega viroma na celovit in sistematičen način. Potrebne bi bile podrobnejše informacije o viromu človeških sluznic, zlasti pri zdravih osebah, kar bo verjetno mogoče v prihodnosti, s tehnološkim napredkom. Boljše razumevanje mehanizmov, s katerimi interakcije med gostiteljem in virusi prispevajo k nastanku kompleksnih bolezni, bi omogočile razvoj novih načinov boja proti tem boleznim. Prevalenca avtoimunskih in vnetnih bolezni namreč narašča. Razumevanje vloge viroma lahko pomagalo razjasniti razloge za ta epidemiološki trend. Poleg tega bi naančna opredelitev okvare v interakciji med gostiteljem in virusom lahko pomagala pri načrtovanju terapije, s pomočjo katere bi interakcijo spremenili in tako zaščitili občutljive posameznike.

Literatura

1. Foxman EP, Iwasaki A. Genome-Virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease. *Nat Rev Microbiology*. 2011; 9(4): 254-64.
2. Wylie KM, Weinstock GM, Storch GA. Emerging view of the human virome. *Transl Res*. 2012; 160(4): 283-90.
3. Monto AS, Cavallaro JJ. The Tecumseh study of respiratory illness. II. Patterns of occurrence of infection with respiratory pathogens. *Am J Epidemiol*. 1971; 94: 280-9.
4. Makela MJ. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 539-42.
5. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*. 2006; 38: 617-9.
6. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science*. 2009; 324: 387-9.
7. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern- recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 644-58.
8. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med*. 1979; 300: 1173-9.
9. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411: 603-6.
10. Hampe J. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007; 39: 207-11.
11. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer C, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 2010; 141: 1135-45.
12. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 1995; 310: 1225-29.
13. Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir*. 2010; (doi:10.1183/09031936.0 0092410).
14. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Resp Crit Care Med*. 2008; 178: 667-72.
15. Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. *J Med Virol*. 2002; 66: 263-8.